

Extratos de própolis no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae*) em tomateiro

Giana Paula Schaffler ⁽¹⁾ Robson Marcelo Di Piero ^{(2)*}

⁽¹⁾ Acadêmica do curso de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

⁽²⁾ Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

* Autor correspondente: *e-mail*: robson.piero@ufsc.br

Resumo

O tomate é uma das hortaliças de maior importância no Brasil e no mundo. Este trabalho teve como objetivo a avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito da própolis de diferentes fontes contra os patógenos *Xanthomonas gardneri* e *Pseudomonas syringae*, bactérias causadoras da mancha e da pinta bacteriana na cultura do tomate. As amostras de própolis foram provenientes de Rancho Queimado/SC (RQ) e São Joaquim/SC, coletadas no verão (SJV) ou inverno (SJI). Para verificar o efeito antimicrobiano dos extratos de própolis sobre as bactérias, realizaram-se testes de incorporação em meio de cultura, de difusão em ágar com papel antibiograma e de formação de biofilme bacteriano em microplaca. Em tomateiros, testou-se o efeito do intervalo de tempo (4 dias, 2 dias ou 2 horas) entre tratamento com própolis RQ (2,0 mg.ml⁻¹) e inoculação de *X. gardneri* ou de *P. syringae* em plantas da variedade Kada e Santa Clara, respectivamente. Por fim, foi avaliado o efeito de própolis RQ (0; 0,5 e 3,0 mg.ml⁻¹) em explantes de ápices caulinares de tomateiros Kada inoculados com *X. gardneri* e de explantes da variedade Santa Clara inoculados com *P. syringae*. Nos testes de incorporação, todas as fontes de própolis e em todas as concentrações (0,1; 0,5 e 1,0 mg.ml⁻¹) foram capazes de inibir o crescimento de *X. gardneri*, mas para *P. syringae* apenas as doses mais elevadas (0,5 e 1,0 mg.ml⁻¹) se mostraram eficientes. No teste de difusão em ágar, as três fontes de própolis não apresentaram halos de inibição contra *X. gardneri* e *P. syringae* que se comparassem ao do bactericida. Observou-se efeito de dose da própolis RQ sobre *X. gardneri*, apresentando mais de 99% de inibição da formação do biofilme bacteriano nas maiores doses testadas (1,5 e 3,0 mg.ml⁻¹). Para *P. syringae*, a

inibição foi de 67,8%, menos evidente que para *X. gardneri*. Em plantas, não foi observado efeito do extrato de própolis RQ (2,0 mg.ml⁻¹) sobre a severidade das bacterioses, independente do intervalo de tempo entre aplicação e inoculação. Em explantes de tomate da variedade Kada, as doses 0,5 e 3,0 mg.ml⁻¹ de própolis RQ reduziram a mancha bacteriana em 37 e 47%. O controle da pinta bacteriana, usando essas mesmas doses, foi de 69 e 75% em explantes de Santa Clara, respectivamente. Com isso, conclui-se que a própolis tem potencial para o controle da mancha e da pinta bacteriana em tomateiros.

Palavras-chave: tomate, própolis, mancha bacteriana, pinta bacteriana, antimicrobiano.

Abstract

The tomato is an important crop in Brazil and worldwide. This study had as objective to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effect of propolis from different sources against pathogens *Xanthomonas gardneri* and *Pseudomonas syringae*, bacteria that cause bacterial spot and speck in tomato crop. The propolis samples were from Rancho Queimado/SC (RQ) and São Joaquim/SC, collected in summer (SJV) or winter (SJI). Tests of incorporation in culture medium, agar diffusion method employing filter paper discs and bacterial biofilm formation in microplate were conducted to verify the antimicrobial effect of propolis extracts on the bacteria. In tomato plants, we tested the effect of time interval (4 days, 2 days, or 2 hours) between treatment with RQ propolis (2,0 mg.ml⁻¹) and inoculation with *X. gardneri* or *P. syringae* in plants of variety Kada and Santa Clara, respectively. Finally, we evaluated the effect of RQ propolis (0; 0,5 and 3,0 mg.ml⁻¹) in tomato shoot explants of Kada variety inoculated with *X. gardneri* and explants of Santa Clara variety inoculated with *P. syringae*. Incorporation tests results demonstrated that all sources of propolis and at all concentrations (0,1; 0,5 e 1,0 mg.ml⁻¹) were able to inhibit *X. gardneri* the growth, but only higher doses (0,5 and 1,0 mg.ml⁻¹) were efficient against *P. syringae*. In agar diffusion test the three sources of propolis showed no inhibition halo against *X. gardneri* and *P. syringae* which compared the bactericidal. Was observed dose effect of RQ propolis on *X. gardneri*. Presenting more than 99% inhibition the level of bacterial biofilm formation on the higher doses tested (1,5 e 3,0 mg.ml⁻¹). For *P. syringae*, inhibition was 67,8%, less evident than for *X. gardneri*. In plants, there wasn't effect of RQ propolis extract (2,0 mg.ml⁻¹) on the severity of bacterial diseases, regardless of time interval between application and inoculation. In tomato explants of Kada variety, RQ propolis at 0,5 and 3,0 mg.ml⁻¹ reduced the number of lesions of bacterial spot in 37 and 47%. The

control of bacterial speck using those same doses was 69 and 75% in explants of Santa Clara, respectively. Thus, it's concluded that propolis has potential to control of bacterial spot and speck on tomato plants.

Keywords: tomato, propolis, bacterial spot, bacterial speck, antimicrobial.

1. Introdução

As hortaliças são uma importante fonte de vitaminas e sais minerais para a alimentação humana (CARVALHO et al., 2006). Dentre as plantas hortícolas mais consumidas no mundo está o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), que também possui grande importância para agricultura familiar no estado de Santa Catarina (EPAGRI, 2014).

O tomateiro tem como centro de origem a América do Sul, desde o Equador até o Norte do Chile (ALVARENGA, 2004). Esta cultura, uma tropical de altitude, se adapta bem a diversos climas em praticamente todas as regiões do mundo. Entretanto, alguns fatores podem acarretar na diminuição da produção do tomateiro (FILGUEIRA, 2000).

Dentre os fatores bióticos, alguns patógenos estão envolvidos na diminuição da produção do tomateiro, destacam-se as fitobactérias *Xanthomonas gardneri*, agente causal da mancha bacteriana e *Pseudomonas syringae*, agente causal da pinta bacteriana do tomateiro.

A bactéria *Xanthomonas gardneri* é comum em épocas de clima quente e úmido (KIMATI et al., 1997). A ocorrência de *Pseudomonas syringae* se dá em condições ambientais de temperaturas amenas e alta umidade (SILVA & LOPES, 1995). Ambas as bactérias são de grande importância na cultura do tomate, pois em condições propícias podem causar perdas significativas na produção. A infecção dessas bactérias se dá pelas aberturas naturais das plantas, como estômatos, hidatódios ou ferimentos. Normalmente são disseminadas pela água ou instrumentos de manejo contaminados. (MOURA & OLIVEIRA, 1996). Os sintomas da mancha e da pinta bacteriana são semelhantes, ambas apresentam manchas necróticas locais que, em ataque severo, se alastram por toda a folha. Com isso há redução da área fotossinteticamente ativa das folhas, o que acaba por prejudicar o desenvolvimento e a produtividade das plantas. (KIMATI et al., 1997). Além disso, a pinta bacteriana também pode acometer os frutos causando queda e lesões, que comprometem o valor comercial da produção (SILVA & LOPES, 1995).

O tomateiro pertence à família Solanaceae é muito susceptível ao ataque de diversos patógenos (FILGUEIRA, 2000) e por conta disso é comum a utilização de

grandes quantidades de agrotóxicos, que acabam por aumentar o custo de produção, causar impactos ao homem e ao ambiente, favorecer a seleção de linhagens resistentes aos produtos, além de não apresentarem eficiência suficiente para evitar o ataque em nível de dano econômico às plantações (COQUEIRO, 2010).

No caso de doenças bacterianas, há limitação na disponibilidade de produtos químicos. São usados alguns antibióticos com ação bactericida ou fungicidas à base de cobre (SILVA et al., 2008). Entretanto, esses produtos nem sempre são eficientes, havendo a necessidade do desenvolvimento de produtos eficazes com baixa toxicidade e impacto ambiental reduzido.

Diante do exposto mostra-se, cada vez mais, a necessidade pela busca por métodos alternativos ao controle convencional das doenças de plantas cultivadas pelo homem. É crescente o estudo de produtos naturais, pois a procura por alimentos livres de resíduos tóxicos também aumentou nos últimos anos (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003).

Nesse contexto, a própolis é uma das propostas ao controle das doenças de plantas (PEREIRA, 2004). Trata-se de uma mistura complexa de substâncias, constituída em sua maior parte por resinas e bálsamos de plantas da flora apícola local e cera de abelhas. A sua coloração, a textura e a composição química são muito variadas, dependendo do local onde está localizada a colmeia e da vegetação visitada pelas abelhas (SILVA, 2013).

Em trabalhos anteriores, a própolis demonstrou ação antimicrobiana, antifúngica, bactericida, anestésica, antioxidante, cicatrizante, imunológica, entre outras (SFORCIN, 2009). Entretanto, na agricultura, os estudos são relativamente recentes, restringindo-se às duas últimas décadas e mais intensamente aos últimos dez anos. Bianchini & Bedendo (1998) constataram ação antimicrobiana de extratos aquosos de própolis contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia chrysanthemi* e *Xanthomonas axonopodis* em bioensaios *in vitro*. Em trabalho realizado por Toledo et al. (2009) observou-se o efeito de extratos hidroalcoólicos de própolis sobre o desenvolvimento da pinta preta (*Alternaria solani*) do tomateiro foi menor que em plantas testemunhas. De acordo com Moraes et al. (2011) o extrato alcoólico de própolis tem uma eficiência igual a de um fungicida sistêmico (tebuconazole) no controle do oídio em tomateiros (*Oidium* spp.).

Além disso, de acordo com a Instrução Normativa número 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a própolis é um produto permitido para o uso na agricultura orgânica, que tem seus conceitos fundamentados nos princípios agroecológicos,

como a integridade cultural das comunidades rurais, a equidade social, a valorização econômica das produções familiares e o respeito aos recursos naturais (ABREU et al., 2009).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes extratos de própolis de abelhas *Apis mellifera* sobre o crescimento de *Xanthomonas gardneri* e *Pseudomonas syringae in vitro* e avaliar o efeito da própolis sobre a severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) e da pinta bacteriana (*P. syringae*) em plantas do tomateiro.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC, coordenadas geográficas 27°34'12" sul e 48°30'70" oeste. O trabalho foi realizado de março a junho de 2016. Nesse período, a temperatura média foi de 22,8°C, sendo a máxima observada de 36,4°C, mínima observada de 9,2°C e umidade relativa de 84% em média (LABCLIMAGRI, 2016).

2.1 Obtenção dos patógenos

O isolado de *Xanthomonas* foi obtido a partir de plantas sintomáticas de mancha bacteriana da variedade “Carmem”, cultivadas em Águas Mornas/SC e cedido pela Empresa Sakata Seed Sudamerica Ltda. A identificação do patógeno foi realizada junto a Embrapa-DF através da técnica de BOX-PCR. Constatou-se que o isolado tratava-se de *Xanthomonas gardneri* (Grupo D) (LUIZ, 2013).

O isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi obtido a partir de plantas sintomáticas de pinta bacteriana em plantio comercial no município de Coimbra/MG. Este isolado foi gentilmente cedido pelo Professor José Ribeiro da Universidade Federal de Viçosa. A bactéria foi identificada por sequenciamento do gene 16S rRNA e foram realizados testes de patogenicidade de acordo com Schaad, Jones e Chun (2001) (ANDRADE et al., 2013).

Ambas as bactérias foram mantidas em tampão fosfato (7,4 mM KH₂PO₄; 8,6 mM K₂HPO₄), a temperatura de 25°C (COQUEIRO, 2010).

Para obtenção do inóculo foi realizada repicagem da bactéria retirada do tampão fosfato para placas de Petri contendo Nutriente Ágar (NA), composição em g.l⁻¹: peptona

de carne 5,0; extrato de carne 3,0; e ágar 12,0. Após 48 ou 72 horas, para *P. syringae* ou *X. gardneri*, respectivamente, as bactérias foram repicadas novamente para placas de Petri contendo NA e incubadas por 48 horas a 25°C. A suspensão bacteriana foi feita com água destilada e ajustada para 0,6 unidades de densidade ótica (DO) a 600 nm para *X. gardneri* e 0,2 DO a 540 nm para *P. syringae*.

2.2 Obtenção dos extratos de própolis

As amostras de própolis foram cedidas por apicultores dos municípios de Rancho Queimado e São Joaquim, Santa Catarina. O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir da maceração de própolis bruta em etanol 70%, na proporção de 1 g de própolis para 4 ml de etanol 70%. O composto resultante da maceração foi transferido para um frasco âmbar e permaneceu em repouso por 24 horas, no escuro. Posteriormente, o material foi filtrado com filtro n. 4 Whatman 9 cm, obtendo-se o extrato hidroalcoólico. Por fim, retirou-se uma alíquota de 1 ml do extrato, a qual foi pesada em balança analítica, seca a 60°C e novamente pesada, para determinação da concentração de matéria seca (MS) presente em cada extrato, conforme metodologia adaptada de Ordoñez et al. (2010).

Foram preparados três extratos, provenientes de três diferentes amostras de própolis, podendo ser coletadas em diferentes estações do ano 2014: Amostra 1 (RQ): Rancho Queimado Inverno (74 mg.ml⁻¹ de MS); Amostra 2 (SJV): São Joaquim Verão (146 mg.ml⁻¹ de MS); e Amostra 3 (SJI): São Joaquim Inverno (96 mg.ml⁻¹ de MS).

2.3 Efeito *in vitro* da própolis sobre *X. gardneri* e *P. syringae*

O efeito antimicrobiano dos extratos da própolis contra os patógenos *X. gardneri* e *P. syringae* foi testado através de bioensaios *in vitro* de incorporação em meio de cultura, difusão em ágar e formação de biofilme bacteriano em microplaca.

Foi conduzido teste de incorporação conforme metodologia adaptada de Coqueiro (2010) onde, extratos de própolis RQ, SJV e SJI nas concentrações 0; 0,1; 0,5; e 1,0 mg.ml⁻¹ foram incorporados ao meio de cultura NA e vertidos em placas de Petri, sendo água destilada utilizada como testemunha na concentração 0 mg.ml⁻¹. Após a solidificação do meio, foram pipetados na superfície 50 µl de suspensão bacteriana (diluída ao fator 10⁻⁵) de *X. gardneri* (0,6 DO a 600 nm) ou *P. syringae* (0,2 DO a 540 nm), o que corresponde a aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por ml (COQUEIRO, 2010; ANDRADE et al., 2013). As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas. Após esse

período foi realizada a contagem das UFC que cresceram na superfície do meio. Os resultados foram expressos pela porcentagem de inibição do crescimento bacteriano.

Além deste, foi realizado teste de difusão em ágar com disco de papel antibiograma (OSTROSKI et al., 2008). Para tanto, meio de cultura NA foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação, foi espalhado sobre o meio 50 µl de suspensão bacteriana de *X. gardneri* (0,6 DO a 600 nm) ou *P. syringae* (0,2 DO a 540 nm). As placas ficaram em repouso por 30 minutos para secagem do inóculo e após esse tempo, foram colocados sobre o meio inoculado cinco discos de papel antibiograma, com 6 mm de diâmetro, separados equidistantemente. Posteriormente, foram pipetados nos discos 10 µl de própolis das diferentes fontes a 10 mg.ml⁻¹, bactericida (oxitetraciclina 1,5% e estreptomicina 15%) a 10 mg.ml⁻¹ como controle positivo, ou água destilada como controle negativo. As placas foram vedadas e incubadas por 48 horas. A avaliação foi realizada através da medição do diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano.

Por fim avaliou-se a formação de biofilme bacteriano a partir de suspensões tratadas com própolis RQ em diferentes concentrações. A metodologia utilizada foi adaptada de Lazarevic et al. (2005). Para tanto, foram pipetados 50 µl dos extratos de própolis nas concentrações de 0; 0,05; 0,25; 0,75; 1,5 e 3,0 mg.ml⁻¹ em poços de microplaca de polietileno. Em seguida, pipetou-se 150 µl de suspensão de células de *X. gardneri* ou *P. syringae* ajustadas a 0,04 DO a 600 nm, que haviam crescido em caldo nutritivo por 96 horas. As microplacas foram incubadas a 25°C por 72 horas, sem agitação. Após esse período, a suspensão de própolis e bactérias foi removida dos poços cuidadosamente e as placas foram colocadas a 70°C por 20 minutos. Posteriormente, foi pipetado nos poços 150 µl de safranina 0,5% e após 5 minutos, a safranina foi removida. Foram realizados 5 enxagues com água destilada em cada poço e por fim pipetou-se nos poços 150 µl de etanol-citrato de sódio 0,1 M (1:1) pH 4,0. Essa solução foi lida por espectrofotometria (492 nm) em leitor de microplacas (SpectraMax[®] Paradigm Multi-Mode, Microplate Reader). Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo um poço considerado uma repetição.

2.4 Teste de Patogenicidade

As variedades de tomateiro utilizadas nos experimentos com plantas foram “Kada” e “Santa Clara”, ambas do grupo Santa Cruz. As sementes utilizadas foram adquiridas das empresas Isla[®] (Kada) e Feltrin Sementes[®] (Santa Clara) em comércio local. As mudas

foram cultivadas utilizando-se bandejas de isopor de 128 células e substrato para plantas Tropstrato®. Quando atingiram em torno de 10 cm de altura, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos (2 mudas por vaso) com volume de 2 litros contendo solo mais substrato para mudas Tropstrato®, na proporção de 9:1.

Em todos os testes com plantas, foram utilizadas 5 repetições por tratamento, sendo que duas plantas em um vaso foi considerada uma repetição. Para avaliação da severidade da mancha e da pinta bacteriana nas variedades de tomateiro utilizou-se a escala diagramática de MELLO et al. (1997).

Para realização do teste de patogenicidade, plantas da variedade Kada, contendo 3 a 4 folhas, foram inoculadas com *X. gardneri* na concentração de 0,6 DO a 600 nm ou com *P. syringae* na concentração de 0,2 DO a 540 nm, o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC.ml⁻¹. Igualmente, plantas da variedade Santa Clara, contendo 3 a 4 folhas, foram inoculadas com *X. gardneri* na concentração de 0,6 DO a 600 nm ou com *P. syringae* na concentração de 0,2 DO a 540 nm. Imediatamente após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida e escuro e permaneceram nessas condições durante 48 horas. As avaliações da severidade das doenças foram feitas aos 7 dias após a inoculação.

2.5 Efeito da própolis no controle de *X. gardneri* e *P. syringae* em plantas de tomateiro

Plantas das variedades Kada e Santa Clara, contendo 3 a 4 folhas foram tratadas com água destilada ou extrato de própolis RQ a 2,0 mg.ml⁻¹ através de pulverização foliar, 10 ml de tratamento por vaso com pulverizador acoplado a um compressor de ar de 58 psi. Após 2 horas, 2 dias ou 4 dias as plantas da variedade Kada foram inoculadas com *X. gardneri* (0,6 DO a 600 nm) e as plantas da variedade Santa Clara foram inoculadas com *P. syringae* (0,2 DO a 540 nm). Após a inoculação, as plantas foram submetidas à câmara úmida e escuro por 48 horas. As avaliações da severidade das doenças foram feitas aos 7 e 14 dias após a inoculação.

2.6 Efeito da própolis no controle de *X. gardneri* e *P. syringae* em explantes de tomateiro

Explantes de ápices caulinares contendo duas folhas expandidas foram coletados de tomateiros contendo cinco folhas expandidas, das variedades Kada e Santa Clara, cultivados em casa de vegetação. Os explantes foram mantidos em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução hidropônica (condutividade elétrica de 0,9 mS/cm), que foi

reposta sempre que necessário. Os explantes permaneceram em câmara de crescimento com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente. Após a aclimação, que levou 3 dias, os explantes foram pulverizados com água destilada (testemunha) ou própolis RQ a 0,5 ou 3,0 mg.ml⁻¹. Duas horas após o tratamento, os explantes da variedade Kada foram inoculados com suspensão de *X. gardneri* (0,6 DO a 600) e os explantes da variedade Santa Clara foram inoculados com suspensão de *P. syringae* (0,2 DO a 540 nm). Imediatamente após a inoculação, os explantes foram submetidos à câmara úmida e escuro por 48 horas. As avaliações foram realizadas através da contagem do número de lesões, aos 14 e 21 dias após a inoculação. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo um explante considerado uma repetição.

2.7 Análises Estatísticas

A homogeneidade dos dados foi analisada através do teste de Bartlett. Para verificar a diferença entre as médias foi utilizada análise de variância Anova *one-way/factorial* e o teste de Tukey (P<0,05). As análises foram realizadas através dos *softwares* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007) e Sisvar (FERREIRA, 2003) para análises de regressão.

3. Resultados

3.1 Efeito *in vitro* da própolis sobre *X. gardneri* e *P. syringae*

As três fontes de própolis testadas (RQ, SJV e SJI) foram capazes de inibir o crescimento de *X. gardneri*. Todas as doses testadas, independente da fonte, reduziram o número de unidades formadoras de colônia (UFC) sobre o meio de cultura. Houve efeito similar entre as três fontes, com inibição de mais de 96% do número de UFC de *X. gardneri* já na menor dose testada (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de inibição do crescimento *in vitro* de *X. gardneri* em meio NA contendo diferentes concentrações de três fontes de própolis (média \pm desvio padrão).

| Tratamento | (mg/ml) | Inibição (%) |
|--------------|---------|-------------------|
| Testemunha | - | 0 \pm 0 A |
| Própolis RQ | 0,1 | 99,4 \pm 0,42 B |
| | 0,5 | 99,6 \pm 0,80 B |
| | 1,0 | 99,7 \pm 0,53 B |
| Própolis SJV | 0,1 | 98,2 \pm 1,22 B |
| | 0,5 | 100,0 \pm 0,0 B |
| | 1,0 | 98,6 \pm 1,36 B |
| Própolis SJI | 0,1 | 96,8 \pm 1,7 B |
| | 0,5 | 99,7 \pm 0,53 B |
| | 1,0 | 99,0 \pm 0,86 B |

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística significativa entre os tratamentos de acordo com Teste Tukey ($P < 0,05$). Média da testemunha = 3340 UFC/ml.

No caso de *P. syringae*, a bactéria mostrou-se menos sensível à própolis do que *X. gardneri*, apresentando inibição entre 24 e 36% do número de UFC nas maiores doses testadas. As três fontes de própolis (RQ, SJV e SJI) foram capazes de reduzir significativamente o crescimento das UFC sobre o meio de cultura, apresentando efeito de dose dependente observado através das análises de regressão significativas que foram adequadamente representadas pelo modelo de regressão linear (Figura 1).

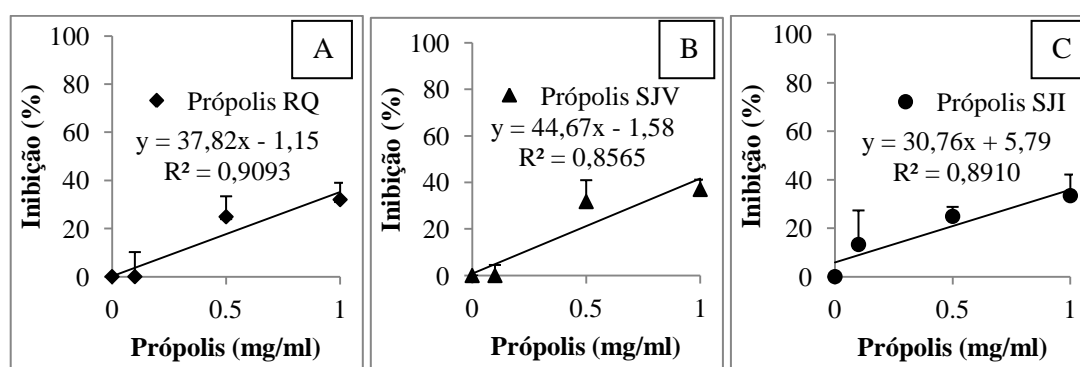


Figura 1. Médias de inibição do crescimento *in vitro* de *P. syringae* em meio NA contendo diferentes concentrações de três fontes de própolis. A: própolis RQ; B: Própolis SJV; C: Própolis SJI. Média da testemunha = 2110 UFC/ml.

Posteriormente, realizou-se teste de difusão em ágar utilizando-se as três fontes de própolis a 10 mg.ml^{-1} . Como se pode observar na tabela 2, nenhuma das fontes de própolis foi capaz de formar halo inibitório de *X. gardneri*, sendo estatisticamente iguais à

testemunha e diferentes do bactericida (controle positivo), o qual apresentou halo inibitório de 16,2 mm. Para *P. syringae* somente a própolis RQ apresentou diferença em relação à testemunha, mas o halo de inibição formado foi menor que 1 mm e não se comparou ao bactericida, que formou um halo de 12,1 mm (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetros dos halos inibitórios proporcionados pelas fontes de própolis RQ, SJV e SJI (10mg.ml⁻¹) e por Estreptomicina+Oxitetraciclina para as bactérias *X. gardneri* e *P. syringae* (média \pm desvio padrão).

| Tratamento | Diâmetro do halo de inibição (mm) | |
|---|-----------------------------------|--------------------|
| | <i>X. gardneri</i> | <i>P. syringae</i> |
| Testemunha | 0 \pm 0 A | 0 \pm 0 A |
| Própolis RQ 10 mg/ml | 2 \pm 1,2 A | 0,9 \pm 0,8 B |
| Própolis SJV 10 mg/ml | 1,6 \pm 1,1 A | 0,5 \pm 0,3 AB |
| Própolis SJI 10 mg/ml | 1,4 \pm 0,9 A | 0,5 \pm 0,6 AB |
| Estreptomicina+Oxitetraciclina 10 mg/ml | 16,2 \pm 2,9 B | 12,1 \pm 2,6 C |

Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de acordo com Teste Tukey (P<0,05).

Ainda, testando-se o efeito antimicrobiano *in vitro*, avaliou-se própolis RQ em diferentes concentrações sobre a formação do biofilme bacteriano em microplaca. Para ambas as bactérias observou-se efeito de dose dependente. A resposta da própolis em relação às bactérias foi representada pelo modelo de regressão polinomial. A inibição máxima foi observada entre as doses 1,5 e 3,0 mg.ml⁻¹. Para *X. gardneri* houve inibição de mais de 92% já na dose 0,75 mg.ml⁻¹ e na maior dose testada a inibição foi de 97,6% da formação do biofilme bacteriano (Figura 2A). Para *P. syringae* observou-se padrão semelhante, com inibição de 52,2% da formação do biofilme bacteriano na dose 0,75 mg.ml⁻¹ e na maior dose testada 67,8%. No entanto, *P. syringae* se mostrou menos sensível à própolis que *X. gardneri* (Figura 2B).

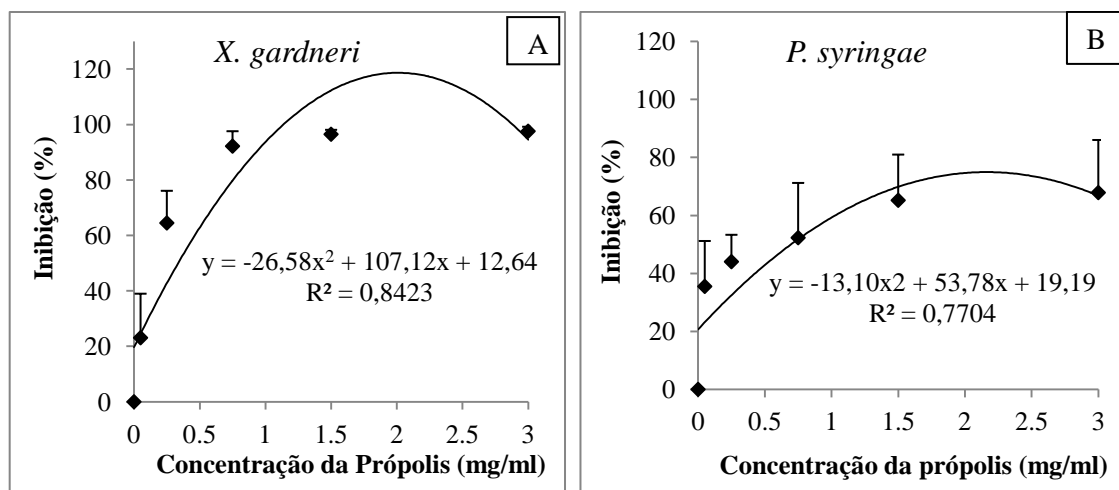


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de própolis RQ sobre a formação de biofilme de *X. gardneri* (A) e *P. syringae* (B). Para *X. gardneri* dados foram transformados pela função $\sqrt{x} + 1$. Testemunha de *X. gardneri* = 0,774 DO a 492 nm e *P. syringae* = 0,672 DO a 492 nm.

3.2 Teste de Patogenicidade

Para realização de experimentos com plantas, inicialmente se testou a patogenicidade das bactérias para avaliação das variedades mais susceptíveis ao ataque de *X. gardneri* e *P. syringae*. Para tanto, foram utilizadas as variedades Kada e Santa Clara.

As plantas da variedade Kada inoculadas com *X. gardneri* apresentaram em média 24% de severidade da mancha bacteriana, enquanto que as plantas da variedade Santa Clara apresentaram apenas 3,2% de severidade, demonstrando uma maior susceptibilidade da variedade Kada a *X. gardneri*, em relação a variedade Santa Clara (Figura 3). As plantas das duas variedades inoculadas com *P. syringae* não apresentaram níveis significativos de sintomas da pinta bacteriana.

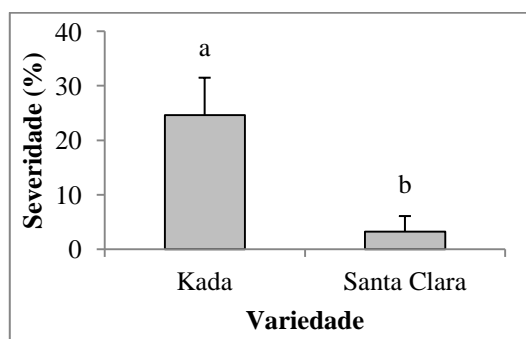


Figura 3. Severidade da mancha bacteriana (*X. gardneri*) em tomateiros das variedades Kada e Santa Clara, 7 dias após a inoculação. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa entre os tratamentos de acordo com Teste Tukey ($P < 0,05$)

Nesse contexto, os experimentos seguintes já foram conduzidos aplicando-se própolis RQ contra *X. gardneri* na variedade Kada e contra *P. syringae* na variedade Santa Clara.

3.3 Efeito da própolis sobre as bacterioses provocadas por *X. gardneri* e *P. syringae* em plantas de tomateiro

Em ambos os experimentos, a própolis RQ ($2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) não reduziu a severidade das doenças em nenhum dos intervalos de tempo testados, não apresentando diferença estatística em relação à testemunha, nas duas avaliações.

Com a variedade Kada, as médias de severidade da mancha bacteriana ficaram entre 23% e 40% na primeira avaliação e 53% e 76,5% na segunda avaliação (Figura 4A). Com a variedade Santa Clara, as médias de severidade da pinta bacteriana ficaram entre 5% e 9,3% na primeira avaliação e 11,8% e 16,3% na segunda avaliação (Figura 4B).

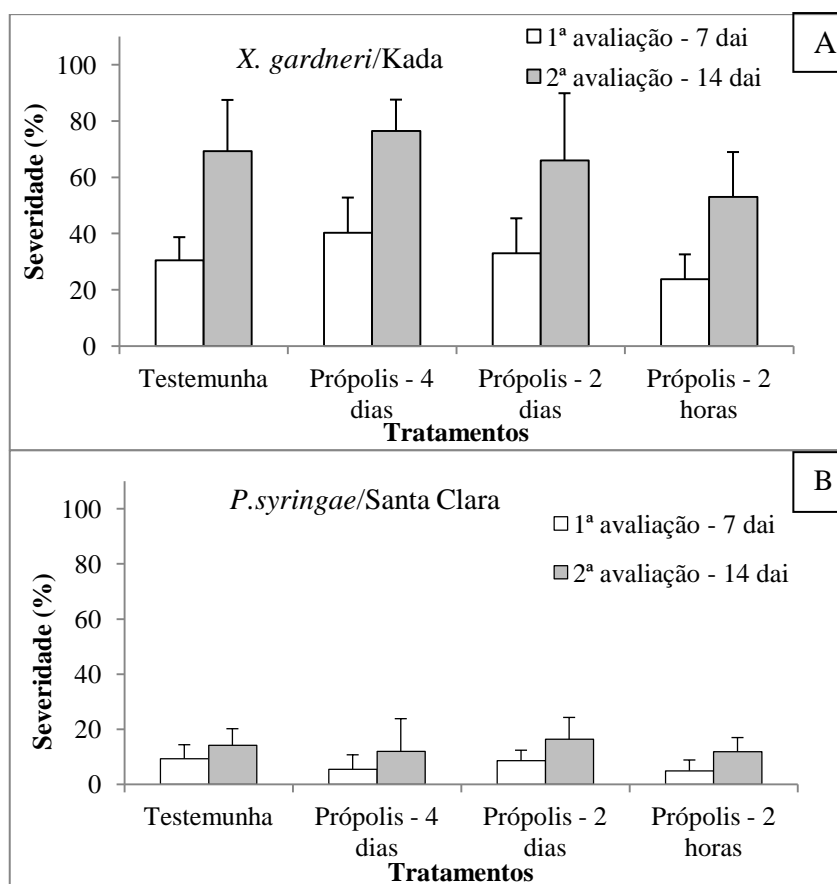


Figura 4. Avaliação do intervalo de tempo (4 dias, 2 dias e 2 horas) entre tratamento dos tomateiros, variedades Kada ou Santa Clara, com água destilada ou própolis RQ (2 mg.ml^{-1}) e inoculação com *X. gardneri* (A) ou *P. syringae* (B).

3.4 Efeito da própolis no controle de *X. gardneri* e *P. syringae* em explantes de tomateiro

Os explantes da variedade Kada não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos em relação à testemunha no número de lesões de mancha bacteriana na primeira avaliação (14 dias após a inoculação). Do mesmo modo, para variedade Santa Clara não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação à testemunha nos explantes inoculados com *P. syringae* na primeira avaliação.

Contudo, na segunda avaliação (21 dias após a inoculação) observou-se padrão similar para as duas variedades. Para variedade Kada, a própolis RQ nas doses 0,5 e 3,0 mg.ml⁻¹ proporcionou, respectivamente, uma redução de 37 e 47% do número de lesões, sendo significativamente menor que a testemunha (Figura 5A). Para variedade Santa Clara a redução do número de lesões da pinta bacteriana foi de 69 e 75%, respectivamente para as duas doses (0,5 e 3,0 mg.ml⁻¹), também significativamente menor que a testemunha (Figura 5B).

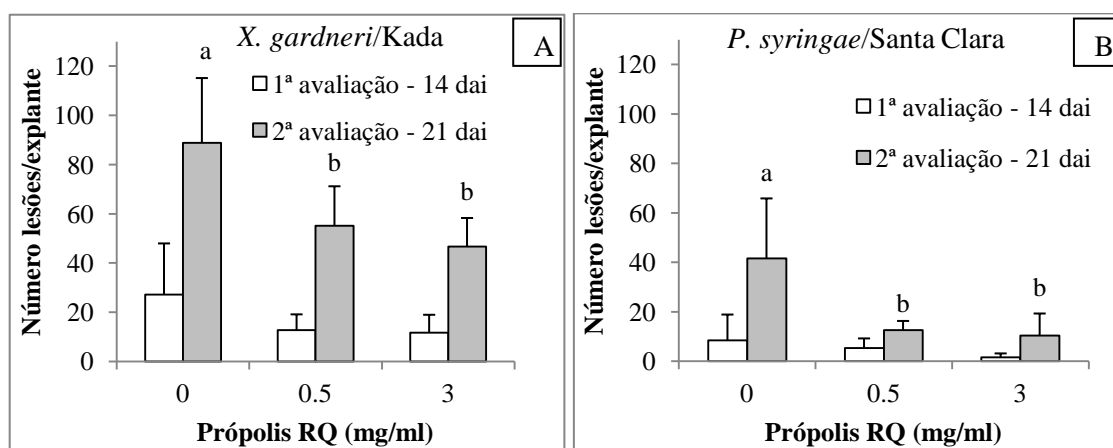


Figura 5. Número de lesões em explantes de tomateiro, variedade Kada ou Santa Clara, tratadas com própolis RQ em diferentes concentrações e inoculadas com *X. gardneri* (A) ou *P. syringae* (B). O Teste F não foi significativo na primeira avaliação. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa entre os tratamentos de acordo com Teste Tukey ($P < 0,05$), na segunda avaliação. Dados foram transformados pela função $\sqrt{x + 1}$ para obtenção de homogeneidade entre as variâncias.

4. Discussão

Os resultados dos testes de incorporação em meio de cultura e formação de biofilme bacteriano demonstraram o efeito direto da própolis sobre o desenvolvimento das fitobactérias *X. gardneri* e *P. syringae*. Constatou-se que *X. gardneri* é mais sensível à própolis que *P. syringae*, com inibição de mais de 96% do número de UFC em placas já na menor dose testada (0,1 mg.ml⁻¹). Para *P. syringae* a inibição não foi tão evidente, com

índices de inibição entre 24 e 36% do número de UFC por placa. Esses resultados corroboram com Baldin et al. (2014) e Jaski et al. (2015) que observaram efeito direto da própolis sobre o desenvolvimento de bactérias do gênero *Xanthomonas*. Além disso, Packer e Luz (2007) constataram que *Pseudomonas aeruginosa* é inibida pela própolis, porém é mais resistente que outros gêneros de bactérias, como *Staphylococcus* e *Escherichia*.

Desde a década de 1990 há relatos de que *P. syringae* pv. *tomato* (SILVA & LOPES, 1995) e *P. syringae* pv. *syringae* (SPOTTS & CERVANTES, 1995) vem apresentando níveis de resistência à antibióticos, principalmente aos cúpricos. Nem todos os isolados apresentaram resistência, mas aqueles resistentes são oriundos de plantios comerciais aonde compostos cúpricos vinham sendo utilizados há muitos anos. Sugere-se que já existia uma população inicial resistente e que fatores como pressão de seleção exercida pelo uso contínuo do mesmo princípio ativo tenham contribuído com o aumento dos níveis de resistência de *Pseudomonas* spp. a antibióticos (QUEZADO-DUVAL et al., 2003; FUENTEFRÍA et al., 2008).

Além disso, a resistência de *Pseudomonas* spp. a determinados antibióticos está associada a complexos mecanismos de resistência. Os principais mecanismos de resistência são a presença de enzimas β -lactamases, alterações na permeabilidade da membrana pela presença de “bombas de expulsão” e mutação de porinas transmembranares. As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel lactâmico dos antibióticos, desta forma destroem o sítio ativo e impedem a sua atividade. As bombas de expulsão são complexos enzimáticos de membrana que expulsam da célula detergentes e substâncias anfipáticas que destruiriam a bactéria. As porinas são proteínas transmembranares localizadas na membrana externa das bactérias e cumprem diversas funções. Em *P. aeruginosa* seu papel é permitir a absorção passiva de aminoácidos básicos através da membrana externa. Além destes, existem outros mecanismos de resistência menos frequentes (GOMES ALVARES et al., 2005). Alguns desses mecanismos poderiam estar presentes em *P. syringae*, ajudando a explicar a menor sensibilidade dessa bactéria à própolis em comparação a *X. gardneri*.

Os resultados do teste de formação de biofilme bacteriano confirmam que *X. gardneri* e *P. syringae* são capazes de formar o biofilme, como foi observado na concentração 0 mg.ml^{-1} da própolis (testemunha). Pois houve maior índice de absorbância neste do que nos demais tratamentos.

A característica de a própolis promover a inibição do biofilme bacteriano foi considerada muito importante, uma vez que a infecção das plantas ocorre muito mais facilmente com uma grande quantidade agregada de células bacterianas que células individuais. O biofilme bacteriano é formado por células bacterianas incorporadas a uma matriz extracelular e polímeros ligados a uma superfície. A formação do biofilme ajuda as bactérias a sobreviver às condições adversas e parece ser um fator muito importante no desenvolvimento de patogêneses, além de poder causar uma barreira física ao contato de antibióticos (BOGINO et al., 2013). A presença de biofilme bacteriano na superfície das folhas de plantas hospedeiras está relacionada com a patogenicidade de várias fitobactérias, como exemplo *X. axonopodis* pv. *citri* (RIGANO et al., 2007).

No teste de difusão em ágar com papel antibiograma, não se observou formação de halo inibitório para *X. gardneri*, pois nenhuma das fontes de própolis apresentou diferença significativa em relação à testemunha. Para *P. syringae*, apenas a própolis RQ foi diferente da testemunha, apesar de apresentar um halo pequeno. Contudo, nenhuma das fontes se comparou ao bactericida (controle positivo). Esse resultado, não contradiz os anteriores, pois esse teste é altamente influenciado por fatores como o meio de cultura, disponibilidade de oxigênio, quantidade de inóculo e as condições da incubação (OSTROSKI et al., 2008). Uma vez que essas condições estão padronizadas, sugere-se que os tipos de moléculas presentes nos extratos de própolis utilizados nos testes podem interferir na difusão do produto no meio de cultura.

Pelo menos duzentos compostos já foram identificados em amostras distintas de própolis de abelhas *Apis mellifera*. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, contudo outros são particulares de cada amostra de acordo com a flora apícola e região geográfica. A composição química da própolis inclui flavonoides, como galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, fenilpropanoides, como ácido cafeico e ácido clorogênico, terpenoides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, entre outras substâncias existentes em menor quantidade. Também há em sua composição elementos minerais, como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (OSKUL, et al., 2004; HAYACIBARA, et al., 2005; MARCUCCI, 1996; LUSTOSA, et al., 2008). Algumas das substâncias presentes na própolis são compostos orgânicos voláteis, que para amostras da região sul do Brasil, são principalmente 2Z,6E-farnesol, nerolidol e espatulenol (BANKOVA, et al., 1999).

Muitas dessas moléculas são voláteis, grandes e complexas que podem ter dificultado a difusão da própolis no meio de cultura. Por conta disso, acredita-se que a própolis não se difundiu de modo adequado no meio, interferindo na formação de halos inibitórios de crescimento bacteriano.

Posteriormente, o teste de patogenicidade sugeriu que a variedade Kada é mais susceptível a *X. gardneri* do que a variedade Santa Clara, o que corrobora com Coqueiro (2010) que afirma que a variedade Kada é susceptível a essa bactéria. De acordo com Malavolta Jr. et al. (2002) e Krause et al. (2001) a variedade Santa Clara é susceptível à *P. syringae*.

No teste de proteção que avaliou os diferentes intervalos de tempo entre tratamento e inoculação não foi observado diferença entre os tratamentos. Contudo, as plantas sofreram estresse durante a realização da câmara úmida, pois a temperatura máxima na casa de vegetação chegou a mais de 45°C. Observou-se necrose nas folhas dos tomateiros, que acabaram por se misturar com as lesões de mancha bacteriana, causada por *X. gardneri* e da pinta bacteriana, causada por *P. syringae*. Sendo assim, a avaliação da severidade das doenças ficou prejudicada. Possivelmente, se avaliou como doença as necroses causadas pelo calor excessivo durante a câmara úmida e por conta disso não foi observado diferença entre os intervalos de tempo. Desta forma, faz-se necessária a repetição desse experimento para confirmação dos resultados.

Em câmara de incubação, a própolis RQ a 0,5 e 3,0 mg.ml⁻¹ apresentou controle eficiente das doenças em explantes de ápices caulinares de tomateiros das variedades Kada e Santa Clara com intervalo de tempo de 2 horas entre o tratamento com própolis e a inoculação com os patógenos nas respectivas variedades. Confirmando os resultados observados, Zibetti et al. (2009) constataram efeito de extratos de própolis sobre a severidade da mancha bacteriana do maracujá (*X. campestris* pv. *passiflorae*) de maneira acentuada. Ordoñez et al. (2010) observaram redução na severidade da pinta bacteriana (*P. syringae* pv. *tomato*) em frutos de tomate pulverizados com extratos de própolis.

Nesse experimento, as condições ambientais foram controladas (temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas) e não houve necrose foliar causada pelo estresse do calor. Além disso, a avaliação foi realizada através do número de lesões, não havendo a possibilidade de confundir os sintomas da doença. Portanto, esses resultados foram mais confiáveis que os observados em casa de vegetação.

Os níveis de controle observados para mancha e pinta bacteriana em explantes de tomateiros, inoculados após 2 horas do tratamento com a própolis, reforça o efeito antimicrobiano direto da própolis sobre as duas fitobactérias. Assim como foi observado nos testes de incorporação em meio de cultura e formação de biofilme bacteriano.

Autores como Uzel et al. (2005) afirmam que a atividade antimicrobiana da própolis é atribuída principalmente à flavonona pinocembrina, ao éster feniletil do ácido cafeico e ao flavonol galagina. Acredita-se que componentes como flavonoides, ácidos benzoico, cinâmico, cafeico agem na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos estruturais e funcionais (SCAZZOCHIO et al., 2005).

Além do efeito antimicrobiano direto, autores como Baldin e colaboradores (2014) observaram que a aplicação de extratos de própolis induz a síntese da fitoalexina faseolina em feijoeiros e sugeriu que a própolis tem potencial para desencadear respostas de defesa vegetal. Sendo assim, sugere-se que novos estudos, como atividade de enzimas relacionadas ao sistema de defesa vegetal e efeito curativo, sejam feitos com a própolis em diferentes culturas para investigação dessa hipótese e uma melhor elucidação do(s) modo(s) de ação dessa substância.

5. Conclusões

Conclui-se que a própolis de abelhas *Apis mellifera* (RQ, SJV e SJI) apresentou efeito antimicrobiano sobre as bactérias *Xanthomonas gardneri* e *Pseudomonas syringae*, especialmente na primeira. Própolis RQ também foi capaz de controlar a severidade das doenças mancha e pinta bacteriana em explantes de tomate das variedades Kada e Santa Clara. Desta forma, a própolis apresenta potencial para o controle dessas fitobactérias de importância na cultura do tomate. Contudo, novos estudos fazem-se necessários para uma melhor compreensão dessa substância utilizada como método de controle de doenças de plantas.

6. Referências

ABREU, L. S.; KLEDAL, P.; PETTAN, K., RABELLO, F., MENDES, S. C. Trajetória e situação atual da agricultura de base ecológica no Brasil e no estado de São Paulo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 26, n. 1/3, p. 149-178, 2009.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Editora UFLA, 2004.

ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle

da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p 28-34, 2013.

BALDIN, D.; SCARIOT, E.; TELAXKA, F. J.; JASKI, J. M.; FRANZENER, G.; MOURA, G. S.; GROSSELLI, M. A. Indução de faseolina em feijão e na atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pelo extrato etanólico de própolis. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2014.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1999, p. 190-193, 1999.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, 1998.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. M.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15838-15859, 2013.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariuna: EMBRAPA Meio ambiente, 2003.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 397-404. 2006.

COQUEIRO, D. S. O. **Atividade de quitosanas e da fração polissacarídica da babosa para o controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas gardneri*) e pinta preta (*Alternaria solani*) em plantas de tomate**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

EPAGRI. **Epagri e o desenvolvimento sustentável catarinense: uma parceria de sucesso**. Relatório da Epagri/SC, 2014.

FERREIRA, D. F. **SISVAR v. 4.3**. Universidade Federal de Lavras, 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura: agrotecnologia modernana produção e comercialização de hortaliças**. Editora da UFV, 2000.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 470-473, 2008.

GOMES ALVARES, C. A.; CASTRO, A. L. L.; GONZALES, M. J. P.; JIMENEZ, M. L. P. N. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: understanding a dangerous enemy. **Revista de La Facultad de Medicina**, v. 53, n. 1, p. 27-34, 2005.

HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M. BROWN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. *In vitro* and *vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal Ethnopharmacology**, v. 101, p. 110-115, 2005.

JASKI, J. M.; FRANZENER, G.; MOURA, G. S.; SCHEFFER, D. C.; TELAXKA, F. J. Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde sobre fitobactérias do feijoeiro. **Anais do V Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal da Fronteira Sul**, v. 5, 2015.

KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 3ª edição. Editora Agronômica Ceres, 1997.

KRAUSE, R.; KUROZAWA, C.; SCOTT, J. W.; CATÂNEO, A. Avaliação de genótipos de tomateiro à mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 1, p. 60-62, 2001.

LABCLIMAGRI – **Laboratório de Climatologia Agrícola da UFSC**. Coordenador Prof. Rosandro Boligon Minuzzi, 2016. Disponível em: <<http://www.labclimagri.ufsc.br/>>

LAZAREVIC, V. SOLDÓ, B.; MÉDICO, N.; POOLEY, H.; BRON, S.; KARAMATA, D. *Bacillus subtilis* α-Phosphoglucomutase Is Required for Normal Cell Morphology and Biofilm Formation. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 39-45, 2005.

LUIZ, C. **Efeito de polissacarídeos no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e da podridão negra da couve-flor (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; NETO, J. R.; BERIAM, L. O. S.; MELO, P. C. T. Caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro

no Brasil e relação de cultivares/genótipos de tomateiro a esse patovar e ao patovar *tomato*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 69, n. 1, p. 63-66, 2002.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.

MELLO, S. C.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.447-448, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa número 46**, de 6 de outubro de 2011.

MORAES, W. B.; JESUS JUNIOR, W. C.; BELAN, L. L.; PEIXOTO, L. A.; PEREIRA, A. J. Aplicação foliar de fungicidas e produtos alternativos reduz a severidade do oídio do tomateiro. **Nucleus**, v. 8, n. 2, p. 57-68, 2011.

MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 184, p. 15-18, 1996.

ORDÓÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; NIEVA MORENO, M. I.; ISLA, M. I. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v. 166, p. 578-584, 2010.

OSTROSKI, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLÜ, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, p. 742-747, 2004.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, n. 1, p.102-107, 2007.

PEREIRA, C. S. **Bee products in plant propagation and control of gray leaf spot (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) and coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & BR.)**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 670-675, 2003.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QÜESTA, J.; MAXWELL DOW, J.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formayion, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 10, p. 1222-1230, 2007.

SCAZZOCCHIO F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, v. 4, p. 327-333, 2005.

SFORCIN, J. M. **Própolis e imunidade: comprovações científicas**. Editora Unesp, São Paulo-SP, 2009.

SHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3ª edição. 398 p., 2001.

SILVA, C. C. F. **Caracterização química de quatro amostras de própolis brasileiras. Isolamento de substâncias e teste das atividades antioxidante e anti-HIV**. Tese de Doutorado em Ciências (Botânica) da Universidade de São Paulo, 2013.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. AB.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana em tomateiro. **Ciências Agrotécnicas**, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 85-89, 1995.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 179-183, 1995.

SPOTTS, R. A.; CERVANTES, L. A. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. **Plant Disease**, v. 79, n. 11, p. 1132-1135, 1995.

STATSOFT. **Electronic Statistics Textbook**, 2007. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>>

TOLEDO, M. V.; STANGARLIN, J. R.; BONATO, C. M. Controle da pinta preta em tomateiro com preparados homeopáticos de própolis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2 p. 471-474, 2009.

UZEL A; SORKUN K; ÖNÇAG Ö; ÇOGULO D; GENÇAY Ö; SALIH B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

ZIBETTI, A. P.; MOREIRA, F. C.; ABREU FILHO, B. A.; BONATO, C. M. Efeito de medicamentos homeopáticos em maracujazeiro (*Passiflorae* sp.) infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Anais do V Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, v. 5, 2009.